

DETECÇÃO DE BACTÉRIAS ALCANOTRÓFICAS EM SOLOS E SEDIMENTOS DE MANGUE DA BACIA PETROLÍFERA POTIGUAR

Matheus Silva Pereira^{1*} (UFRN), Sílvia R. B. de Medeiros (UFRN),
Lucymara, Fassarella A. Lima (UFRN), Carlos Alfredo Galindo Blaha (UFRN)²

Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, Departamento de Biologia Celular e Genética,
Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

*Mestre PPgGBM-CB/UFRN

Av. Salgado Filho S/N, Campus Universitário, Lagoa Nova CEP 59072-917, Natal, RN, Brasil.

¹matheusufrn@yahoo.com.br ²blaha@biocomp.ufrn.br

Alguns microrganismos de ecossistemas virgens são capazes de utilizar petróleo como fonte de carbono e energia. O conhecimento dessa biodiversidade microbiana pode revelar vias metabólicas microbianas para utilizar alcanos que venham a ter importância biotecnológica. Os objetivos deste estudo são prospectar e avaliar a resposta de comunidades de microrganismos alcanotróficos de solos e sedimentos de mangue da Bacia Petrolífera Potiguar (BPP) e solo da Mata Atlântica na Reserva Horto de Dois Irmãos-PE utilizando o gene *alkB* como biomarcador molecular com as técnicas de PCR e PCR-DGGE. Os microcosmos foram contaminados ou não com 3% de óleo. O mDNA (DNA metagenômico) foi extraído do microcosmo em intervalos de dois meses durante um ano de experimento. As análises do screening molecular foram realizadas em gel de agarose (1,8%) e PAGE (12%). Amplicons de tamanho esperado (~256pb e ~560bp) foram obtidos. Usando o biomarcador para o gene *alkB* foi possível encontrar evidências de bactérias alcanotróficas em sedimentos de mangue da BPP nas amostragens de tempos 60d, 120d e 240d principalmente nos microcosmos contaminados. Por outro lado, em solos de Mata atlântica na área de reserva do Horto de Dois Irmãos-PE, as amostragens nos tempos de 00d, 60d, 300d e 360d mostraram evidências preferencialmente nos microcosmos contaminados. A resposta de comunidades microbianas alcanotróficas nativas de solos e mangue da BPP ao impacto de contaminação por petróleo através de PCR e PCR-DGGE sugerem uma dinâmica de comunidades de comunidades alcanotróficas podem estar presentes em ambientes sem histórico de contaminação por petróleo inclusive em ambientes alheios a Bacia Petrolífera Potiguar – RN como a Mata Atlântica na Reserva Horto Dois Irmãos-PE. Nossas pesquisas sugerem que as bactérias alcanotróficas nativas dos solos e ambientes virgens podem, através de métodos de bioestimulação, ser utilizadas em bioremediação, evitando assim a introdução de microrganismos exóticos à Bacia Petrolífera Potiguar – RN. O conhecimento sobre microbiologia do petróleo na BPP pode contribuir para a indústria do petróleo e para uma melhor administração de investimentos e as responsabilidades ambientais política e social.

Microcosmos-1, Alcanotróficoss-2, alkB-3, metagenômica-4.

1. INTRODUÇÃO

Nosso conhecimento a respeito da diversidade microbiana é, em parte, limitado por nossa inabilidade em reproduzir todas as variáveis ambientais dos microrganismos nos diferentes tipos de ecossistemas. Todos os organismos da biosfera dependem das atividades microbianas pela sua capacidade no processo de ciclagem de nutrientes e, de certa forma, por influenciar os ambientes abaixo e acima do solo. No entanto, diversas atividades antropogênicas como a indústria do petróleo, podem potencialmente afetar a biodiversidade microbiana local, sendo desconhecidas como estas alterações nas comunidades microbianas podem influenciar os ecossistemas mais profundos e os mais superficiais. Devido à escassez de informações dos microrganismos nativos nos solos de ambientes que não tiveram nenhum tipo de exposição ao petróleo ou derivados, houve a necessidade da realização de estudos microbiológicos e moleculares destes microrganismos em diferentes ecossistemas localizados dentro da Bacia Petrolífera Potiguar - RN, como por exemplo, através de ensaios de microcosmos com solos de mangue, utilizando a técnica independente de cultivo PCR-DGGE. Este trabalho é o primeiro estudo de biodiversidade de bactérias alcanotróficas nativas sob impacto de contaminação com petróleo em solos continentais e costeiros Bacia Petrolífera Potiguar (BPP) e Mata Atlântica-PE utilizando o biomarcador molecular *alkB*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O petróleo é um recurso não renovável resultante de processos físico-químicos e biológicos sofridos pela matéria orgânica depositada geologicamente, sendo que sua exploração comercial ocorre há mais de 140 anos e desde o início os engenheiros do petróleo têm enfrentado problemas causados por microrganismos (Atlas, 1981; Magot *et al.*, 2000; Van Hamme *et al.*, 2003; Head *et al.*, 2003). O petróleo sofre diversas transformações físicas e biológicas que são reguladas pelas características específicas do derramamento e do ambiente atingido. Assim, o grau de impacto ambiental e a persistência do petróleo no ambiente dependem de fatores como: habitat atingido, tipo e quantidade do óleo, espécies de organismos atingidos, época do ano, condições hidrográficas e meteorológicas, clima, frequência e duração da exposição ao petróleo e as práticas utilizadas na tentativa da descontaminação.

O petróleo e seus derivados podem persistir por mais de vinte anos em manguezais, antes que a vegetação se recupere totalmente. Esta alta persistência é explicada pela lenta biodegradação dos hidrocarbonetos devido à limitação de oxigenação do meio e a lenta ciclagem dos nutrientes, essenciais para a atividade microbiana aeróbia (Scherrer e Mille, 1989). A persistência dos hidrocarbonetos depende também da exposição do sítio contaminado aos fluxos de águas marinhas, influenciados pelas marés. A maior frequência de exposição a esses fluxos pode acelerar a remoção dos hidrocarbonetos, contribuindo para a recuperação da vegetação (Getter *et al.*, 1984). Os derramamentos de petróleo e seus derivados constituem a principal e mais danosa causa de contaminação nos solos e águas. Entretanto, processos como a bioremediação podem ser utilizados para minimizar os impactos ambientais causados (Head *et al.*, 2003).

Uma grande quantidade de estudos da diversidade microbiana biodegradadora de petróleo e/ou seus derivados e xenobióticos realizam as análises em ambientes associados a petróleo (Smits *et al.*, 1999; Orphan *et al.*, 2000) inclusive no Brasil (Santos de Oliveira, 2001; Luz *et al.*, 2004 e Sette *et al.*, 2006). No entanto, praticamente se desconhece sobre a diversidade de comunidades microbianas nativas de locais não impactados, porém com potencialidades de o serem, como os realizados no Kuwait (Obuekwe *et al.*, 2003), na Alemanha (Kloos *et al.*, 2006) e no Rio de Janeiro, Brasil (Evans *et al.*, 2004ab).

Pesquisas sobre a diversidade microbiana nativa em diferentes ecossistemas de bacias petrolíferas no Brasil são limitadas. Na Bacia Petrolífera Potiguar-RN (BPP), a mais importante produtora de petróleo *on shore*, Santos (2006) verificou através da técnica de PCR-DGGE que a população microbiana nativa de solos de Macau/RN (Caatinga) e de Diogo Lopes-RN (Mangue) apresentava uma dinâmica de comunidades em resposta à contaminação por petróleo em função do tempo e tipo de solo impactado, inclusive em amostras de solo da Mata Atlântica na Reserva Horto Dois Irmãos-PE localizada fora da BPP. Coutinho (2005) demonstrou a ocorrência de microrganismos nativos de Diogo Lopes-RN (Mangue) e da Mata Atlântica na Reserva Horto Dois Irmãos-PE com potencial de produção de biomassa microbiana utilizando petróleo como única fonte de carbono. Silva (2005) isolou bactérias redutoras de Ferro (III) dos solos amostrados por Santos (2006) com potencial petrodegradador em aerobiose e anaerobiose. Souza Junior (2006) avaliou a produção de biosurfactantes em bactérias biodegradadoras de petróleo isoladas por Coutinho (2005) e Silva (2005), observando que estas apresentam uma produção aumentada de moléculas biosurfactantes quando crescem em petróleo como única fonte de carbono.

Neste trabalho, avaliaremos a ocorrência e diversidade de microrganismos alcanotróficos nativos através da aplicação de métodos moleculares como PCR-DGGE, em um *screening* metagenômico utilizando o gene catabólico envolvido na biodegradação de n-alcenos em amostras de microbiomas nativos da Bacia Petrolífera Potiguar-RN (BPP), na área de proteção ambiental (Mangue) e fora da BPP na Reserva do Horto de Dois Irmãos-PE.

3. METODOLOGIA

3.1. Locais de amostragem de solos e sedimentos

Os locais de amostragens foram escolhidos de forma aleatória: Distrito de Macau-RN em Diogo Lopes-RN (05°05'39'' de Latitude Sul e 36°21'33'' de Longitude Oeste) na área de Proteção Ambiental (Mangue), pertencente à Bacia Petrolífera Potiguar, sem nenhum histórico registrado de contaminação por petróleo. E no Horto de Dois Irmãos-PE (08°03'00'' de Latitude Sul e 34°59'17'' de Longitude Oeste) área de reserva florestal em remanescente de Mata Atlântica, localizada fora da Bacia Petrolífera Potiguar, em local selvagem não afetado por ação antrópica e sem histórico de contaminação por petróleo.

3.2. Construção do ensaio de microcosmo

A construção do ensaio de microcosmo foi realizada por Santos (2006) As amostragens dos solos de microcosmos para análises foram realizadas a cada 2 meses (Tempos 0, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 dias), durante um período total de 12 meses de experimento (Figura 1).

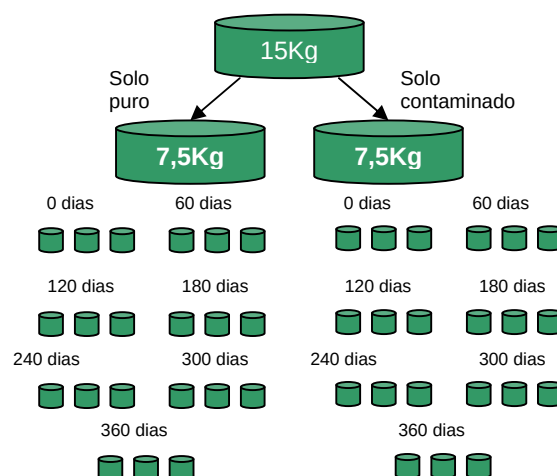


Figura 1. Ilustração do ensaio de microcosmo (à esquerda) e desenho esquemático de sua montagem (à direita).

3.3. Linhagens bacterianas utilizadas

As cepas bacterianas *Escherichia coli* W3110 (pGEC47) contendo o operon *alk*, *Pseudomonas putida* GPo1 (comumente conhecida como *Pseudomonas oleovorans* GPo1) (pOCT), e *P. putida* GPo12 (curada do pOCT) (Smits *et al.*, 2002) utilizadas como controle positivo foram cedidas pelo pesquisador Dr. Bernard Witholt do Instituto Federal de Tecnologia da Suíça (ETHZ).

3.4. Desenho de oligonucleotídeos para PCR

Foi construída uma base de dados de genes *alk* de degradação de alcanos, através de mineração em bancos de dados: NCBI (The National Center for Biotechnology Information - USA), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - JAPÃO) e UMBBD (University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database - USA). A escolha das seqüências nucleotídicas para desenho dos primers degenerados *dmatt* foi realizada a partir de alinhamentos múltiplos gerados pelo programa CLUSTALW (Higgins e Sharp, 1988). Para a escolha dos primers específicos *mat* para o gene *alkB* de *Pseudomonas* foi utilizado o programa Fast PCR (by Ruslan Kalendar, versão 3.8.82 para Windows) e foi adicionado na extremidade 5' do primer forward específico, denominado de *matg*, um grampo de GC com 40 nucleotídeos 5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G 3' (Nakatsu *et al.*, 2000). Também foram utilizados os primers universais baseados no gene 16S rDNA que foram desenvolvidos por Santos (2006). Todos os primers foram sintetizados por Integrated DNA Technologies.

3.5. Extração de DNA metagenômico de solos e extração de DNA genômico dos isolados microbianos

O mDNA das amostras de solos puros e contaminados do microcosmo foram extraídos utilizando o kit FastDNA SPIN (BIO101, Carlsbad, CA, USA). A solução de DNA foi estocada no freezer (-20°C).

3.6. PCR e DGGE

O programa de ciclagem (denominado DOWNTM) foi o mesmo para ambos os pares de primers ISBA (rDNA16S), *dmatt* (*alkB* primer degenerado) e *matg* (*alkB* primer específico), como descrito por Santos (2006). Para amostras de DNA metagenômicos foi utilizado o seguinte protocolo de PCR: 1 µL de DNA (~40 ng/ µL), 1 µL de 2,5 mM MgCl₂, 2 µL de tampão de PCR10X (Biosystem), 2 µL de primer forward (20 pmol), 2 µL primer reverse (20 pmol), 1 µL DNTPs e 2,5 U de Taq polimerase Taq (Biosystem) e/ou alternativamente GoTaq® Flexi DNA Polymerase (PROMEGA). Após a reação de PCR com mDNA, as amostras foram analisadas em gel de agarose a 1,8%, colorados com brometo de etídio 0,5µg/ml e visualizadas em transiluminador de UV (Cole Parmer 97500, Chicago, USA). As mesmas reações de PCR foram analisadas pela técnica de PCR-DGGE, utilizando o aparelho DGGE-1001 (C.B.S., Scientific Company). A eletroforese foi realizada utilizando um gel de poliacrilamida 8% durante 16 horas a 80V e 22mA, com gradiente de desnaturação uréia-formamida de 40%

a 60%. Em cada canaleta do DGGE foram aplicados 10 µl das reações de PCR. Os géis foram corados com nitrato de prata 0,2% e fotodocumentados no sistema Kodak (Kodak Edas 290 1D v3.5.4. Scientific Imaging Systems, New Haven, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários microrganismos são capazes de crescerem em presença de alcanos em virtude de possuírem uma alcano hidroxilase que ativa alcano a 1-alcanol. Este depois será metabolizado por uma álcool-desidrogenase e uma aldeído desidrogenase a ácidos graxos, as quais serão incorporadas ao metabolismo central do microrganismo (Van Beilen *et al.*, 2002). As maiorias destes microrganismos descritos na literatura é proveniente de ambientes contaminados pelo petróleo e/ou seus derivados localizados em diversos países, inclusive o Brasil. Porém, são poucos os trabalhos realizando análises de comunidades microbianas degradadoras de petróleo e seus derivados em regiões não impactadas localizadas em locais de risco ambiental. O nosso trabalho é pioneiro no Brasil na prospecção de comunidades de microrganismos nativos alcanotróficos provenientes de solos não contaminados por petróleo (e seus derivados) de áreas de mangue da BPP e da Mata Atlântica (Reserva Horto de Dois Irmãos-PE).

A prospecção por PCR utilizando primers degenerados dm_{at} para o gene *alkB* em mDNAs provenientes dos ensaios de microcosmo, quer solo puro quer contaminado com petróleo, de Diogo Lopes-RN (mangue) e Horto de Dois Irmãos permitiram detectar diferentes produtos de amplificação em relação ao amplicom esperado (243 pb para o gene *alkB* de *P. putida* GPo1), como mostrado nas Figuras 2 e 3 para os solos de Mangue e Mata Atlântica, respectivamente. Estes resultados sugerem a ocorrência de microrganismos que possuem o gene *alkB* ou mais de uma cópia deste e até mesmo genes relacionados, assim como descrito por Smits *et al.*, (1999) (*Acinetobacter* sp ADP), Whyte *et al.*, (2002) (*Rhodococcus* NRRL B16531 e NRRL Q15), Hara *et al.*, (2004) (*A. burkensis* SK2) em isolados bacterianos e também em amostras ambientais como descrito por Luz *et al.*, (2004) ao verificar a presença de múltiplas cópias deste gene em amostras ambientais de Cubatão-SP.

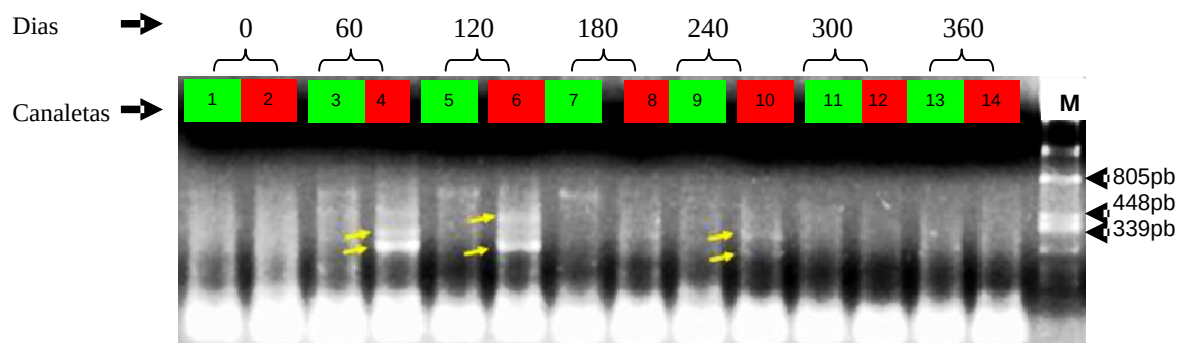


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,8% do PCR com mDNA do microcosmos de Diogo Lopes (DL) com os primers degenerados dm_{at}. Cor verde- microcosmo solo puro, cor vermelha - microcosmo solo contaminado com petróleo. M é marcador.

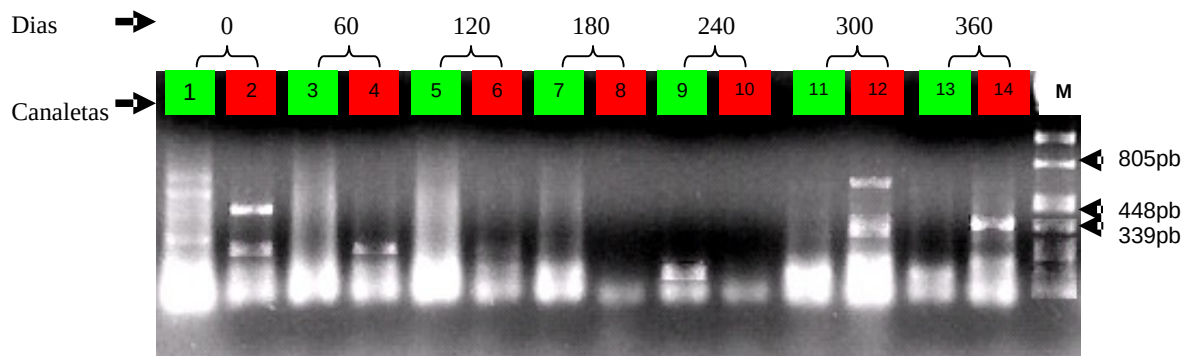


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,8% do PCR com mDNA do microcosmos de Dois Irmãos-PE com os primers degenerados dm_{at}. Cor verde- microcosmo solo puro, cor vermelha - microcosmo solo contaminado com petróleo. M é o marcador

Nossos resultados experimentais revelam mudanças na dinâmica de comunidades microbianas alcanotróficas avaliadas através do screening metagômico utilizando o gene *alkB* nos diferentes tipos de solos estudados. Os amplicons foram observados em resposta a variáveis ambientais ou agentes tóxicos como o petróleo, podendo ser deduzido que o efeito biocida aumentou nos primeiros 04 meses, levando ao desaparecimento dos produtos de PCR (Figuras 2 e 3), ressurgindo na amostra 240d, quando aconteceria uma provável adaptação das comunidades microbianas nativas para novamente serem reduzidas ou ausentes nos tempos de coleta 300d e 360d (Figura 3). Situações experimentais como realizadas em nossa abordagem foram também observadas em diferentes microrganismos por diferentes autores, tais como: Barbosa *et al.* (2006) e Halet *et al.* (2006), porém nenhum destes utilizaram petróleo.

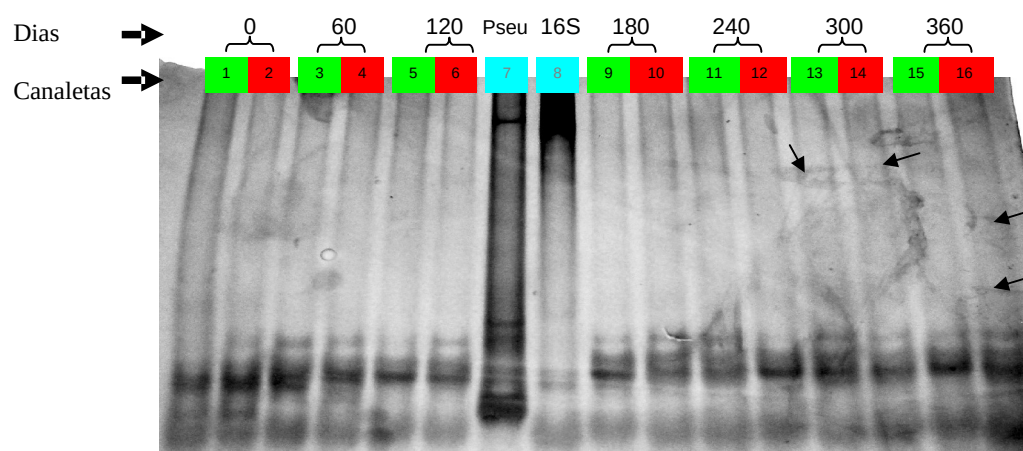


Figura 4. Perfil de DGGE das amplificações de mDNA do microcosmo do solo de Diogo Lopes-RN com os primers matg. Cor verde- microcosmo solo puro, cor vermelha - microcosmo solo contaminado com petróleo. Pseu – *Pseudomonas*, 16S - Pool de bactérias com os primers 16S rDNA (Santos, 2006).

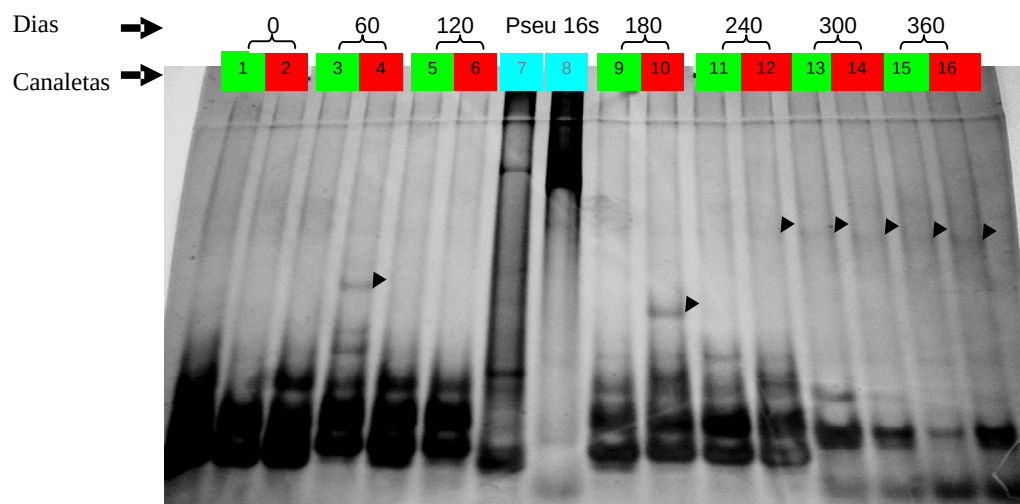


Figura 5. Perfil de DGGE das amplificações de mDNA do microcosmo do solo de Dois Irmãos-PE com os primers matg. Cor verde- microcosmo solo puro, cor vermelha - microcosmo solo contaminado com petróleo. Pseu – *Pseudomonas*, 16S - Pool de bactérias com os primers 16S rDNA (Santos, 2006).

A utilização de primers degenerados ou específicos permitiram inferir que os primers matg que não detectaram a ocorrência de DNA molde de bactérias alcanotróficas nas diferentes amostras de mDNA e tipos de solos ou se encontram abaixo do nível de detecção da técnica de PCR ou não estavam suficientemente representados nos solos tropicais analisados (Figuras 4 e 5). No entanto, Whyte *et al.* (2002) e Luz *et al.* (2004) conseguiram detectar o gene *alkB* em solos poluídos através de técnicas de hibridização de DNA. Embora

autores detectassem *Pseudomonas* em manguezais tropicais, inclusive na Baía da Guanabara-RJ, eles não relatam a ocorrência de genes *alkB* (Brito *et al.*, 2006). Esses ecossistemas apresentam características intrínsecas diferentes quando comparadas com os locais de amostragem de nosso estudo, o que pode ter uma relação direta com a biodiversidade nativa microbiana. Dados de sequenciamento nucleotídico de DNA destes amplicons gerados em nosso screening metagenômico contribuirão para a identificação molecular dos microrganismos nativos nos solos avaliados.

5. CONCLUSÕES

Utilizando o gene *alkB* como biomarcador molecular foi possível encontrar evidências da ocorrência de bactérias alcanotróficas no sedimento de mangue da Bacia Petrolífera Potiguar – RN e no solo da Mata Atlântica na Reserva Horto Dois Irmãos-PE. A resposta de comunidades microbianas alcanotróficas nativas de solos e mangue da Bacia Petrolífera Potiguar – RN ao impacto de contaminação por petróleo através de PCR e PCR-DGGE sugerem uma dinâmica de comunidades em função do tempo e da presença do petróleo. Nossos resultados sugerem que comunidades microbianas alcanotróficas podem estar presentes em ambientes sem histórico de contaminação por petróleo, inclusive em ambientes alheios à Bacia Petrolífera Potiguar – RN como a Mata Atlântica na Reserva Horto Dois Irmãos-PE. Estas pesquisas sugerem que as bactérias alcanotróficas nativas dos solos e ambientes virgens podem, através de métodos de bioestimulação, ser utilizados em eventuais experimentos de bioremediação, evitando assim a introdução de microrganismos exóticos à Bacia Petrolífera Potiguar – RN. Este estudo é pioneiro no Brasil na bioprospecção de comunidades de microrganismos alcanotróficos nativos provenientes de solos não contaminados por petróleo (ou derivados) de áreas de mangue da BPP e da Mata Atlântica (Reserva Horto de Dois Irmãos-PE).

6. AGRADECIMENTOS

Ao CT-PETRO/CNPq pelo apoio financeiro, ao programa de pós-graduação em genética e biologia molecular (PPG-GBM) e à CAPES pela bolsa mestrado.

7. REFERÊNCIAS

- ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiol. Rev.** v.39, p. 180-209, Mar 1981
- BAPTISTA, I. I.; PEEVA, L. G.; ZHOU, N. Y.; LEAK, D. J.; MANTALARIS, A.; LIVINGSTON, A. G.; Stability and performance of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 during 1,2-dichloroethane biodegradation. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, p.4411 – 4418, 2006.
- BARBOSA, V. L.; ATKINS, S. D.; BARBOSA, V. P.; BURGESS, J. E.; STUETZ, R. M. Characterization of *Thiobacillus thioparus* isolated from an activated sludge bioreactor used for hydrogen sulfide treatment. **J. Appl. Microbiol.** v.101, p.1269 – 1281, 2006.
- BRITO, E. M.; GUYONEAUD, R.; GONI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M. A.; WASSERMAN, J. C.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Res. Microbiol.** v.157, p.752 – 762, 2006.
- COUTINHO, L. G. **Avaliação in vitro da diversidade microbiana em solos de mangue e mata atlântica contaminados por petróleo.** Natal:UFRN/Biblioteca Central Zila Mamede, 2005.
- EVANS, F. F.; ROSADO, A. S.; SEBASTIAN, G. V.; CASELLA, R.; MACHADO, P. L. O. A.; HOLMSTRÖM, C.; KJELLEBERG, S.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.49, p.295 – 305, 2004a.
- EVANS, F. F.; SELDIN, L.; SEBASTIAN, G. V.; KJELLEBERG, S.; HOLMSTRÖM, C.; ROSADO, A. S. Influence of petroleum contamination and biostimulation treatment on the diversity of *Pseudomonas* spp. in soil microcosms as evaluated by 16S rRNA based-PCR and DGGE. **Lett. Appl. Microbiol.** v.38, p.93 – 98, 2004b.
- GETTER, C. D.; CINTRON, G.; DICKS, B.; LEWIS, R. R.; SENECA, E. D. The recovery and restoration of salt marshes and mangrove following an oil spill. In: Cairns J, Buikema A L Restoration of habitats impacted by oil spills. **Boston Butterworth.** p.65 – 113, 1984.
- HALET, D.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Community dynamics of methanotrophic bacteria during composting of organic matter. **J. Biosci. Bioeng.** v.101, p.297 – 302, 2006.
- HEAD, I. M.; JONES, D. M.; LARTER, S. R. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. **Nature.** v.426, p.344 – 351, 2003.

- KLOOS, K.; MUNCH, J. C.; SCHLOTER, M. A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. **J. Microbiol. Methods**. v.66, p.486 – 496, 2006.
- LUZ, A. P.; PELLIZARI, V. H.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**. v.50, p.323 – 333, 2004.
- MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.77, p.103 – 116, 2000.
- NAKATSU, C. H.; TORSVIK, V.; OVREAS, L. Soil Community Analysis Using DGGE of 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Products. Published in Soil. **Sci. Soc. Am. J.** v.64, p.1382 – 1388, 2000.
- OBUEKWE, C.; HOURANI, G.; RADWAN, S. Hydrocarbon bioremediation potential of an unimpacted Kuwaiti oil-field environment. **Acta. Microbiol. Pol.** v.52, p.405 – 417, 2003.
- ORPHAN, V. J.; TAYLOR, L. T.; HAFENBRADL, D.; DELONG, E. F. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. **Appl Environ. Microbiol.** v.66, p.700 – 711, 2000.
- SANTOS DE OLIVEIRA, F. J. **Biorremediação de Solo Arenoso Contaminado por Óleo Cru**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2001.140p.
- SANTOS, I. L. V. L. **Prospecção de microrganismos e genes envolvidos em biodegradação de Petróleo**. Natal:UFRN/Biblioteca Central Zila Mamede, 2006. 59p.
- SCHERRER, P.; MILLE, G. Biodegradation of crude oil in an experimentally polluted peaty mangrove soil. **Mar. Pollut. Bull.** v.20, p.430 – 432, 1989.
- SETTE, L. D.; SIMIONI, K. C.; VASCONCELLOS, S. P.; DUSSAN, L. J.; NETO, E. V.; OLIVEIRA, V. M. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 2006.
- SILVA, C. L. V. **Estudos de bactérias redutoras de Ferro (III) relacionadas com petróleo**. Natal:UFRN/Biblioteca Central Zila Mamede, 2006. 43p.
- SMITS, T. H.; BALADA, S. B.; WITHOLT, B.; VAN BEILEN, J. B. Functional analysis of *alkane* hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria. **J. Bacteriol.** v.184, p.1733 – 42, 2002.
- SMITS, T. H.; RÖTHLISBERGER, M.; WITHOLT, B.; VAN BEILEN, J. B. Molecular screening for *alkane* hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. **Environ. Microbiol.** v.1, p.307 – 318, 1999.
- SOUZA JUNIOR, M. J. **Produção de moléculas Biosurfactantes em bactérias isoladas de solos de mangue da Bacia Petrolífera Potiguar-RN (BPP-RN)**. Natal:UFRN/Biblioteca Central Zila Mamede, 2006.
- VAN BEILEN, J. B.; SMITS, T. H. M.; WHYTE, L. G.; SCHORCHT, S.; RÖTHLISBERGER, M.; PLAGGEMEIER, T.; ENGESSER, K. H.; WITHOLT, B. Alkane hydroxylase homologues in gram-positive strains. **Environ. Microbiol.** v.4, p.676 – 682, 2002.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol. Mol Biol Ver.** v.67, p.503 – 549, 2003.
- WHYTE, L. G.; BOURBONNIÈRE, L.; GREER, C. W. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (*alk*) and naphthalene (*nah*) catabolic pathways. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p.3719 – 3723, 1997.
- WHYTE, L. G.; SMITS, T. H. M.; LABBÉ, D.; WITHOLT, B.; GREER, C. W.; VAN BEILEN, J. B. Gene Cloning and Characterization of Multiple Alkane Hydroxylase Systems in *Rhodococcus Strains* Q15 and NRRL B-16531. **Appl. Environ. Microbiol.** v.68 p.5933 – 5942, 2002.

DETECTION OF ALKANOTROPHIC BACTERIA IN PETROLIFEROUS BASIN POTIGUAR SOILS AND MANGROVE

Some microorganisms from virgins ecosystems are able to use petroleum it as source of carbon and energy, as for example the alkanotrophics bacteria. The knowledge of microbial biodiversity can help to reveal new metabolic systems for utilization alkanes with biotechnological importance. The aim of this study is prospect and analyze the response of the indigenous microbial alkanotrophics communities in soil and mangrove sediments of Basin petrolíferous Potiguar (BPP) and soil of Atlantic forest in the Horto Dois Irmãos Reserve area/PE in microcosm assay using the molecular biomarker gene *alkB* with the PCR and PCR-DGGE approach. The microcosms were uncontaminated or contaminated with 3% of oil. The mDNA (metagenomic DNA) was extracted from the microcosms in intervals of two months during one year of the experiment. The analyses of the molecular screening were made by electrophoresis in agarose gel (1.8%) and PAGE (12%). PCR amplicons of expected

size (~256pb and ~560bp) were obtain. Using the biomarker *alkB* gene was possible to find evidences of the alkanotrophics bacteria in mangrove of BPP at sampling time 60d 120d 240d preferentially on contaminated microcosms. On the other hand, in soils of Atlantic forest in Horto de Dois Irmãos -PE Reserve area at sampling time 00d, 60d, 300d and 360d preferentially on contaminated microcosms. The response of the native microbial communities in soils and mangrove (inside BPP) to petroleum impact in PCR and PCR-DGGE suggest a community dynamics in presence of petroleum and time related. Our results suggest that microbial alkanotrophic communities could be present in places never contaminated by the petroleum including environment outside BPP like the Atlantic forest in Horto Dois Irmãos Reserve area/PE. Our researches suggest that indigenous alkanotrophic bacteria from soils and natural environment could be using in bioremediation strategies by bioestimulation assays avoid the use of exotics microorganisms on BPP. This study is the first report of indigenous alkanotrophic bacteria in soils and mangrove of BPP. The knowledge about the petroleum microbiology in the BPP may help to petroleum industry for better administration of investments and politic on environmental and social responsibilities.

Microcosm-1, Alkanotrophics-2, alkB-3, metagenomic-4.

Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo deste artigo.